



PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

Internationales Büro

(51) Internationale Patentklassifikation⁶: A61K 47/48		A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/02046
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE96/01206		(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 23. Januar 1997 (23.01.97)	
(22) Internationales Anmeldedatum: 5. Juli 1996 (05.07.96)			(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
(30) Prioritätsdaten: 195 24 515.6 5. Juli 1995 (05.07.95)	DE	Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>	
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM STIFTUNG DES ÖFFENTLICHEN RECHTS [DE/DE]; Im Neuenheimer Feld 280, D-69120 Heidelberg (DE).			
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): WIESSLER, Manfred [DE/DE]; Konstanzer Strasse 21, D-69126 Heidelberg (DE). BEYREUTHER, Konrad [DE/DE]; Ludolf-Krehl-Strasse 25, D-69190 Heidelberg (DE).			
(74) Anwalt: HUBER, Bernard; Truderinger Strasse 246, D-81825 München (DE).			

(54) Title: SACCHARIDE CONJUGATES

(54) Bezeichnung: SACCHARID-KONJUGATE

(57) Abstract

The invention concerns a conjugate comprising a saccharide and one or a plurality of active substances. The invention also concerns the use of the conjugate.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Konjugat, umfassend ein Saccharid und einen oder mehrere Wirkstoffe, sowie die Verwendung des Konjugats.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AM	Armenien	GB	Vereinigtes Königreich	MX	Mexiko
AT	Österreich	GE	Georgien	NE	Niger
AU	Australien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BB	Barbados	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BE	Belgien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BF	Burkina Faso	IE	Irland	PL	Polen
BG	Bulgarien	IT	Italien	PT	Portugal
BJ	Benin	JP	Japan	RO	Rumänien
BR	Brasilien	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
BY	Belarus	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SG	Singapur
CG	Kongo	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CH	Schweiz	LI	Liechtenstein	SK	Slowakei
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CM	Kamerun	LR	Liberia	SZ	Swasiland
CN	China	LK	Litauen	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
EE	Estland	MG	Madagaskar	UG	Uganda
ES	Spanien	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	MN	Mongolei	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MR	Mauretanien	VN	Vietnam
GA	Gabon	MW	Malawi		

Saccharid-Konjugate

Die vorliegende Erfindung betrifft Saccharid-Konjugate und ihre Verwendung.

Allgemein besteht bei vielen Wirkstoffen, insbesondere solchen für die Krebstherapie und solchen, die in bestimmte Organe und deren Zellen, z.B. Gehirn, Neurone, Glia-, Astroglia- und andere nicht-neuronale Zellen, gelangen sollen, das Problem, daß diese schlecht an ihren Wirkort transportiert werden und daher erhebliche Nebenwirkungen haben.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, ein Mittel bereitzustellen, mit dem Wirkstoffe verschiedenster Art gezielt an ihren Wirkort transportiert werden können, so daß ihre Nebenwirkungen reduziert werden können.

Erfundungsgemäß wird dies durch die Gegenstände in den Patentansprüchen erreicht.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit ein Konjugat, umfassend ein Saccharid und einen oder mehrere Wirkstoffe.

Die vorliegende Erfindung beruht auf der Erkenntnis des Anmelders, daß β -D-Glucose-Isophosphoramid gute anti-Tumor-Eigenschaften bei äußerst geringen Nebenwirkungen im Vergleich zu Cyclophosphoramid und Isophosphoramid hat. Ferner hat er erkannt, daß β -D-Glucose-Isophosphoramid durch einen gerichteten

Transport in die Tumorzellen gelangt. Für diesen Transport hat sich ein Glucosetransporter als wesentlich erwiesen.

Auf der Basis vorstehender Erkenntnisse wurden Konjugate entwickelt, in denen ein oder mehrere Wirkstoffe an ein Saccharid, insbesondere ein Monosaccharid, Disaccharid oder Oligosaccharid, gebunden sind. Als Monosaccharid sind insbesondere Glucose, ganz besonders D-Glucose, Galaktose, Mannose, Arabinose, Xylose, Fucose, Rhamnose, 2-Amino-2-deoxyglucose, 2-Fluor-2-deoxyglucose, N-Acetyl-2-amino-2-deoxyglucose, N-Acetyl-2-amino-2-deoxygalaktose, Digitoxose und 2-Amino-2-deoxygalactose zu nennen. Als Disaccharid eignen sich insbesondere Maltose, Laktose oder Gentobiose, entweder 1,4- oder 1,6-verknüpft. Als Oligosaccharid ist insbesondere ein lineares und verzweigtes, z.B. di-, tri-, insbesondere N,N'-Di-2-chlorethyl-(3,6-di-O-(β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl)-phosphorsäureesterdiamid, und tetraantennäres Oligosaccharid zu erwähnen.

Als Wirkstoff kommen jegliche therapeutisch und/oder diagnostisch verwendbare Substanzen in Frage. Dies sind insbesondere:

Antioxidantien, z.B. Cystein, N-Acetylcystein, α -Tocopherol (Vitamin E), Probucol, α -Lipponsäure, Limonen (Perillasäure), Xanthine, Carotinoide und Nitrone, Antirheumatika, Antiallergika, Antianämika, Antibiotika, z.B. Sulfonamide, Antidiabetika, Antiemetika, Antihistaminika, Antiepileptika, β -Rezeptorblocker, Calciumantagonisten, ACE-Hemmer, Broncholytika, Antiasthmatische, Cholinergika, Corticoide, Dermatika, Diuretika, Enzyminhibitoren, Gichtmittel, Grippemittel, Sedativa, Immuntherapeutika, Lebertherapeutika, Lipidsenker, Migränemittel, Muskelrelaxantien, Narkosemittel, Neuropathiepräparate, Antihyperkinetika, Psychopharmaka, Schilddrüsentherapeutika, Sexualhormone und ihre Hemmstoffe, Spasmolytika, Vitamine, Wundbehandlungsmittel, Analgetika, z.B. Indometacin, Paracetamol, Ibuprofen und Acetylsalicylsäure, Cimetidin, Tumortherapeutika, z.B. Cyclophosphoramid, Isophosphoramid, cis-Platin-Komplexe, Antimetabolite, wie Methotrexat und 5-Fluoruracildesoxyribosid, und Topoisomeraseinhibitoren, wie Mitoxan-

thon, Tumordiagnostika, Radiosensitizer, z.B. Misonidazol, Inhibitoren der DNA-Reparatur, z.B. O⁶-Benzyldeoxyguanosin, α -Sympathomimetika, z.B. L-Dopa und Dopamin, Nukleinsäuren, z.B. Oligonukleotide, und Anti-AIDS-Mittel, wie Azidothymidin, Dideoxyinosit und Dideoxycytidin..

Die Bindung zwischen dem Saccharid und dem oder den Wirkstoffen kann in üblicher Weise vorliegen. Günstig ist es, wenn zumindest eine Bindung über die 1-Position des Saccharids vorliegt. Dies hat den Vorteil hat, daß am Wirkort, d.h. in der Zelle, der über die 1-Position des Saccharids gebundene Wirkstoff enzymatisch abgespalten und freigesetzt wird.

In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Konjugats ist das Saccharid zumindest mit einem Wirkstoff über einen üblichen Linker verbunden. Als Linker eignen sich besonders Diole, ganz besonders kurzkettige Diole von 1,2-Diol, z.B. Ethylenglykol, bis 1,6-Hexandiol.

Erfindungsgemäße Konjugate reichern sich in Zellen, Organen und Geweben an, die Glucosetransporter und/oder verwandte Transporter davon aufweisen. Die Konjugate reichern sich insbesondere in Leber, Niere, Herz, Thymus, Schilddrüse, Darm und Gehirn sowie in allen Arten von Tumoren an.

Erfindungsgemäße Konjugate eignen sich daher besonders zur Behandlung neurologischer Erkrankungen, wie Morbus Alzheimer, Schlaganfall, Morbus Parkinson und andere Demenzerkrankungen. Hierfür ist es günstig, wenn die Konjugate Antioxidantien als Wirkstoff enthalten. Diese Wirkstoffe verhindern, daß in aeroben Zellen eine unvollständige Reaktion des Sauerstoffs in der mitochondrialen Elektronentransportkette stattfindet und es dadurch zur Freisetzung von Superoxidradikalen, Hydroxylperoxiden oder Hydroxylradikalen ins Cytosol kommt, was zum Zelltod führen kann. Bei Schlaganfall und anderen arteriosklerotischen Erkrankungen wird durch die Gabe von Antioxidantien besonders die Oxidation von LDL-

Partikeln zu Lipidperoxiden gehemmt, die ein kritisches Ereignis bei der Bildung arteriosklerotischer Plaques darstellen. Bei der Behandlung von Morbus Parkinson hat sich außerdem die Verwendung von L-Dopa oder Dopamin als Wirkstoff bewährt.

Erfindungsgemäße Konjugate, die Antioxidantien als Wirkstoffe enthalten, eignen sich ferner zur Behandlung von kardiovaskulären Erkrankungen, Diabetes, Entzündungen, insbesondere rheumatische Arthritis, entzündliche Darmerkrankungen und Pankreatitis, Bluthochdruck und Lungenerkrankungen, z.B. ideopathische pulmonäre Fibrosis und Cystische Fibrose, AIDS-verursachte Apoptose von CD4-T-Zellen, Arteriosklerose, Osteoporose, Ischämie, Katarakt sowie Multiple Sklerose. Ferner eignen sich solche Konjugate auch im Sinne der Vorbeugung gegen vorstehend erwähnte Erkrankungen, insbesondere arteriosklerotische Erkrankungen und Morbus Alzheimer.

Des Weiteren können erfindungsgemäße Konjugate, wenn sie entsprechende Wirkstoffe enthalten, erfolgreich zur Therapie bzw. Diagnose von Tumoren verwendet werden. Beispiele von therapeutisch verwendbaren Wirkstoffen sind Cyclophosphoramid und Isophosphoramid. Weiter sind insbesondere Radiosensitizer, wie Misonidazol, zu nennen, die zu einer tumorspezifischen Verstärkung der einer Radio- und/oder photodynamischen Therapie führen. Des Weiteren sind besonders Inhibitoren der DNA-Reparatur, wie O⁶-Benzyldeoxyguanosin, zu erwähnen. Diese Wirkstoffe tragen zur tumorspezifischen Verminderung der DNA-Reparaturkapazität und damit zur Verbesserung einer Therapie durch alkylierende Tumor-Chemotherapeutika bei. Zur Tumorthерапie und Prävention von Tumorerkrankungen eignen sich auch Konjugate, die Antioxidantien enthalten. Durch diese Wirkstoffe wird, wie vorstehend angegeben, die Bildung freier Radikale unterbunden, welche bekanntermaßen zu einer Zellschädigung führen und eine Entartung von Zellen begünstigen. Konjugate mit Antioxidantien können daher auch zum Schutz gesunder Zellen bei Chemo- und Bestrahlungstherapien verwendet werden. Ferner

weisen jüngste Ergebnisse des Anmelders darauf hin, daß erfindungsgemäße, Tumortherapeutika enthaltende Konjugate weit weniger einer Resistenz gegenüber den Tumortherapeutika unterliegen als diese alleine.

Des Weiteren eignen sich erfindungsgemäße Konjugate, die Nukleinsäuren, z.B. Oligonukleotide, als Wirkstoffe enthalten, zur Diagnose und/oder Therapie von Gen-Defekten, insbesondere solchen, die organspezifisch sind.

Darüberhinaus können erfindungsgemäße Konjugate auch zur Bekämpfung von Erregern jeglicher Art eingesetzt werden, die einen Glucosetransporter oder einen damit verwandten Transporter aufweisen. Solche Erreger sind insbesondere Viren, Bakterien und Einzeller. Somit eignen sich erfindungsgemäße Konjugate auch zur Behandlung von durch solche Erreger verursachten Erkrankungen, z.B. virale Infektionen, insbesondere AIDS.

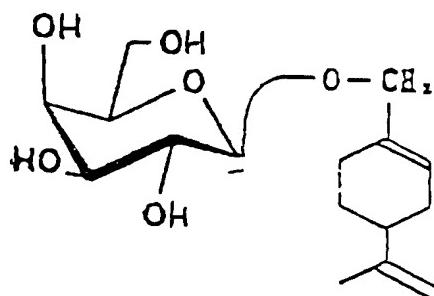
Die Erfindung wird durch die folgenden Beispiele erläutert.

Beispiel 1: Herstellung eines erfindungsgemäßen Konjugats, β -D-Galactopyranosid-[4-(1-methylethenyl)-1-cyclohexen-1-yl]methyl

In einem ausgeheizten 500 ml Dreihalskolben wurden unter Lichtschutz 250 ml abs. Diethylether, 7,5 g Silbercarbonat, 25 g fein gepulvertes Molekularsieb (4 Å) und 2,3 ml (0,15 mol) des Antioxidanz S(-)Perillaalkohol 15 Min. gerührt. Dann wurden 6 g (0,15 mol) Tetraacetyl- α -bromgalactose in 100 ml abs. Diethylether in kleinen Portionen während einer Stunde hinzugefügt. Die Reaktion wurde dünn-schichtchromatographisch (Kieselgel PE/Essigester 4:1 v/v) verfolgt. Nach 10 Std. wurde das Reaktionsgemisch filtriert und die festen Rückstände mit Aceton gewaschen. Danach wurde mit einer 5% NaHCO₃-Lösung und Wasser gewaschen, mit Na₂SO₄ getrocknet, im Vakuum eingeengt und säulenchromatographisch (Kieselgel

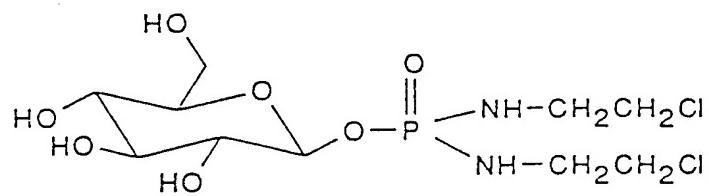
PE/Essigester 6:1 v/v) gereinigt. Es wurden 3,05 g des Anomerengemisches als farbloses Öl erhalten. Eine HPLC-Chromatographie zeigte ein Produktverhältnis von $\beta:\alpha = 2,92$. Die Abspaltung der Acetylschutzgruppen erfolgte in nahezu quantitativer Ausbeute durch Umsetzung mit Triethylamin 1 Std. bei Raumtemperatur.

Das erhaltene Produkt hat die Strukturformel:



Beispiel 2: Herstellung und Verwendung eines erfindungsgemäßen Konjugats, β -D-Glucosylisophosphoramid (β -D-Glc-IPM)

1,0 mM Glycosylimidat wurde in 20 ml Acetonitril gelöst. Nach Zugabe von 1,0 mM Isophosphoramid (Haloxan^R) wurde 6 Stunden unter Rückfluß in der Dunkelheit erhitzt. Nach Filtration und Einrotation wurde gemäß üblicher Verfahren an Kieselgel chromatographiert. Das erhaltene β -D-Glc-IPM hat die folgende Strukturformel:



Dieses Konjugat wurde nach üblichen Verfahren mit ^{14}C markiert und zur nachstehenden Behandlung von Ratten verwendet.

Als Ratten wurden weibliche Sprague-Dawley-Ratten (SD-Ratten; erhältlich von Charles River Wiga, Sulzfeld, Deutschland) und männliche Kopenhagen-Ratten (erhältlich von Harlan Sprague Dawley, Indianapolis, USA) eingesetzt.

Den Kopenhagen-Ratten wurden frische Stücke (2x2 mm) von Dunning-Prostata-Tumorgewebe transplantiert. Die Tumoren ließ man ca. eine Woche wachsen bis diese gut tastbar, aber noch nicht nekrotisch waren.

Gruppen von 5 gesunden SD-Ratten erhielten i.v.-Injektionen von 315 mg/kg β -D-Glc-IPM, bzw. 56,2 mg/kg β -D-Glc IPM. 5 der tumor-tragenden Kopenhagen-Ratten erhielten 315 mg/kg β -D-Glc-IPM. Die radioaktive Dosis pro Injektion betrug etwa 20 μ Ci. Ein Tier jeder Gruppe wurde mit Co₂ 10 Minuten, 1 Std, 2 Std, 8 Std bzw. 24 Std. nach Verabreichung der Injektion getötet. Das Gewebe der Ratten wurde für eine übliche Mikrotom-Präparation vorbereitet und die Schnitte wurden wie von Ullberg, S., (1977), In: Alvefeldt, O. (ed.) Special issue on whole-body autoradiographie. Science Tools, Bromma, Sweden, p.2). beschrieben, einer Autoradiographie unterworfen.

Es zeigte sich, daß sich das erfindungsgemäße Konjugat bereits nach 10 Minuten in Organen, insbesondere Leber, Nieren, Thymus und Schilddrüse, angereichert hatte. Zentrales Nervensystem, einschließlich Gehirn, wies das Konjugat nach 8 Stunden auf. Desweiteren fand sich auch eine starke Anreicherung des Konjugats im Tumorgewebe.

Patentansprüche

1. Konjugat, umfassend ein Saccharid und einen oder mehrere Wirkstoffe.
2. Konjugat nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens ein Wirkstoff über die 1-Position des Saccharids gebunden ist.
3. Konjugat nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Saccharid ein Monosaccharid ist.
4. Konjugat nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß das Monosaccharid ausgewählt ist aus Glucose, Galaktose, Mannose, Arabinose, Xylose, Fucose, Rhamnose, 2-Amino-2-deoxyglucose, 2-Fluor-2-deoxyglucose, N-Acetyl-2-amino-2-deoxyglucose, N-Acetyl-2-amino-2-deoxygalaktose, 2-Amino-2-deoxygalactose und Digitoxose.
5. Konjugat nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Saccharid ein Disaccharid ist.
6. Konjugat nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß das Disaccharid ausgewählt ist aus Maltose, Laktose und Gentobiose.
7. Konjugat nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Saccharid ein Oligosaccharid ist.
8. Konjugat nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß das Oligosaccharid ein verzweigtes Oligosaccharid, insbesondere N,N'-Di-2-chlorethyl-(3,6-di-O-(β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl)-phosphorsäureesterdiimid ist.

9. Konjugat nach einem der Ansprüche 1-8, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff ausgewählt ist aus Antioxidantien, Analgetika, Cimetidin, Tumorthapeutika, Tumordiagnostika, Radiosensitizer, Inhibitoren der DNA-Reparatur, α -Sympathomimetika und Nukleinsäuren.
10. Konjugat nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß das Antioxidanz ausgewählt ist aus Cystein, N-Acetylcystein, α -Tocopherol (Vitamin E), Probobocol, α -Lipponsäure, Limonen (Perillasäure), Xanthinen, Carotinoiden und Nitronen.
11. Konjugat nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß das Analgetikum ausgewählt ist aus Indometacin, Paracetamol, Ibuprofen und Acetylsalicylsäure.
12. Konjugat nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß das Tumortherapeutikum ausgewählt ist aus Cyclophosphoramid, Isophosphoramid, cis-Platin-Komplexen, Antimetaboliten und Topoisomeraseinhibitoren.
13. Konjugat nach einem der Ansprüche 1-12, dadurch gekennzeichnet, daß das Saccharid und mindestens ein Wirkstoff über einen Linker verbunden sind.
14. Konjugat nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß der Linker aus kurzkettigen Diolen von 1,2-Diol bis 1,6-Hexandiol ausgewählt ist.
15. Verwendung des Konjugats nach einem der Ansprüche 1-14 zur Diagnose und/oder Therapie.